

**Maria Kała, Wojciech Lechowicz, Roman Stanaszek**

## Typowe dla polskiego narkomana zatrucie wieloma lekami. Opracowanie kazuistyczne

### The multidrug poisoning typical for a Polish drug addict. A case study

Z Instytutu Ekspertyz Sądowych im. Prof. J. Sehna w Krakowie  
Dyrektor: A. Głazek

W pracy przedstawiono metody badań płynów ustrojowych pobranych ze zwłok długoletniego czynnego narkomana. Krew i mocz badano testami TDx i uzyskano wyniki pozytywne dla alkaloidów opium, pochodnych benzodiazepiny i barbituranów. Metodą HPLC–DAD zastosowaną do badań skryningowych na leki kwaśne, obojętne i zasadowe wykazano w moczu obecność fenobarbitalu, temazepamu, morfiny i efedryny. Technika GC/MS–ITD potwierdziła obecność powyższych substancji oraz wykryto kodeinę w moczu. Do analizy ilościowej zastosowano metody HPLC–DAD i GC/MS–ITD. Wykazane anality oznaczano w postaci nie zmienionej oraz jako pochodne trimetylosililowe i tiomocznikowe. Występowanie w płynach ustrojowych wykrytych związków jest typowe dla polskiego narkomana. Oznaczone ich stężenia mieszczą się w zakresie stężeń terapeutycznych (fenobarbital), toksycznych (temazepam) i śmiertelnych (morfina i efedryna).

The methods for the analysis of biological fluids taken from the corpse of a long-term drug addict were presented. The blood and the urine were positively tested by the TDx assays for opium alkaloids, benzodiazepines and barbiturates. The HPLC–DAD was performed to screen the urine for acidic, neutral and basic drugs. Phenobarbital, temazepam, morphine and ephedrine were detected. The GC/MS–ITD was used to confirm the presence of the above mentioned analytes and to detect codeine in urine. Quantitative determinations were carried out by HPLC–DAD and GC/MS–ITD without derivatization and as the trimethylsilyl and thiourea derivatives. The presence of the detected substances in body fluids is typical for a Polish drug addict. Their concentrations are within therapeutic (phenobarbital), toxic (temazepam) and fatal (morphine and ephedrine) concentrations.

Inspiracją do napisania tej pracy był referat prof. S. Raszei (9) przedstawiający warunki, jakie powinny spełniać współczesne publikacje kazuistyczne. Korzystając ze swych długoletnich i bogatych doświadczeń autor stwierdza, że wartości publikowania – i cenne z punktu widzenia odbiorcy – są dobrze udokumentowane, rzadkie przypadki, a także opracowania przedstawiające wszechstronnie analizę zastosowanych metod badawczych. Postulaty te zostały wysunięte w odniesieniu do medycyny sądowej, ale powinny być spełniane również w innych dziedzinach,

a szczególnie w toksykologii sądowej. Bardzo często biegły z dziedziny toksykologii sądowej, działając w swoim ściśle określonym zakresie, jest współpartnerem lekarza z zakresu medycyny sądowej w wydawaniu opinii dla organów wymiaru sprawiedliwości. Trudno jest sobie obecnie wyobrazić orzeczenie o przyczynie zgonu z powodu zatrucia bez chociażby analizy toksykologicznej materiału sekcyjnego. W takich przypadkach zgodność ustaleń faktycznych w sprawie, obrazu sekcji zwłok i wyników analizy toksykologicznej upoważnia medyka sądowego do wydania opinii o przyczynie zgonu. Każdy ekspert we właściwej sobie dziedzinie, powołany w charakterze biegłego, napotyka na trudne do rozwiązania problemy. Dzielenie się więc swoimi doświadczeniami z innymi jest ze wszęch miar pożyteczne; dlatego też opracowania kazuistyczne, również w dziedzinie analizy toksykologicznej są wartościowe, jeżeli dostarczają dobrze udokumentowanych i szczegółowych informacji o niezwykłych przypadkach lub sprawdzonych i godnych polecenia metodach badawczych. Trudno nie docenić wartości danych pochodzących z kazuistyki, stanowiących integralną część kompendiów analityki toksykologicznej takich jak "Clarke's Isolation and Identification of Drugs" (5) czy "Disposition of Toxic Drugs and Chemicals in Man" (1). Interpretacja wyników analizy w odniesieniu do ciężkości zatrucia nie byłaby możliwa bez znajomości licznych doświadczeń innych analityków. Dane co do zakresów stężeń terapeutycznych leków, czy normalnych innych substancji oraz toksycznych i śmiertelnych opierają się na publikowanych przypadkach. Analitycy na co dzień korzystają z tych danych, chociaż zdają sobie sprawę, że wynik jest porównywalny jedynie w obrębie certyfikowanych metod.

W niniejszej pracy przedstawiono przypadek zatrucia dobrze znanymi w naszym kraju środkami: przetworami ze słomy makowej i często razem z nimi przyjmowanymi lekami z grupy barbituranów, benzodiazepin oraz pochodnymi amfetaminy. Celem jej jest przedstawienie metodyki stosowanej w rutynowym postępowaniu analitycznym w Instytucie Ekspertyz Sądowych.

## MATERIAŁ I METODY

Nadesłany do Instytutu materiał stanowiły dwa opakowania seryjne zawierające krew i dwa opakowania seryjne wypełnione moczem. Biegły został również poinformowany, że "krew i mocz pobrano od denata – długoletniego, czynnego narkomana, celem przeprowadzenia analizy na obecność alkoholu i pochodnych makowca".

Rozpuszczalniki do HPLC pochodziły z firmy Baker. Wzorce zakupiono w firmie Sigma, Radian i Merck.

### Metody skryningowe

Zgodnie z ukierunkowaniem sprawy w pierwszej kolejności płyny ustrojowe poddano analizie na zawartość alkoholu metodą chromatografii gazowej. Następnie przystąpiono do badań skryningowych na obecność alkaloidów z grupy opium często im towarzyszących leków z grupy pochodnych benzodiazepiny, kwasu barbiturowego oraz amfetaminy i metamfetaminy. Analizę przeprowadzono metodą immunofluorescencji w świetle spolaryzowanym (FPIA) z użyciem testów TDx

firmy Abbot. Badanie moczu przeprowadzono zgodnie z firmową instrukcją dla każdego rodzaju testu. Badanie próby krwi wykonano po jej 10-krotnym rozcieńczeniu firmowym buforem do rozcieńczeń, poddaniu działaniu ultradźwięków i odwirowaniu. Do wykrywania benzodiazepin zastosowano testy przeznaczone do surowicy, a barbiturany, alkaloidy opium i amfetaminę z metamfetaminą badano testami do moczu (6).

Następnie 2 ml próbę moczu poddano ekstrakcji eterem etylowym ze środowiska kwaśnego (pH=2, 1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) i chloroformem ze środowiska alkalicznego (pH=9, 1M NaHCO<sub>3</sub>+0,1M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>). Uzyskane wyciągi badano metodą wysokosprawną chromatografię cieczową (HPLC) z użyciem chromatografu LaChrom D-7000 System firm Merck-Hitachi wyposażonego w detektor szeregu diod (DAD). Rozdział składników obecnych w ekstraktach prowadzono na kolumnie LiChroCART 125x4 mm z wypełnieniem LiChrospher 60 RP-select B (5 μm) firmy Merck. Jako fazy ruchomej użyto mieszaniny acetonitrylu i 25 mM fosforanu trytyloamonowego (pH=3) podawanej na kolumnę w układzie gradientowym, zgodnie z systemem identyfikacji leków (MTSS) opracowanym przez firmę Merck (8).

### **Metoda potwierdzająca**

Jako technikę potwierdzającą obecność wykazanych w moczu ksenobiotyków zastosowano chromatografię gazową połączoną ze spektrometrią masową (GC/MS). Analizę metodą GC/MS prowadzono używając chromatografu gazowego firmy Varian połączonego ze spektrometrem masowym firmy Finnigan MAT w wersji Magnum. Układ był wyposażony w detektor w postaci pułapki jonowej (ITD) i kolumnę kapilarną DB-5 MS (długości 30 m, średnicy 0,25 mm i grubości filmu 0,25 μm) firmy J&W Scientific. Warunki analizy przedstawiały się następująco: temperatura komory nastrzykowej – 260°C. Jako gazu nośnego użyto helu, a jego przepływ ustawiono na 12cm<sup>3</sup>/min. Temperaturę pieca zaprogramowano następująco: początkowa temperatura 130°C utrzymywała się przez 1 min., następnie wzrastała o 20°C/min do temperatury końcowej 270°C, którą utrzymywano przez 5 min. Czas całego programu wynosił 13 min.

### **Analiza ilościowa**

#### **Barbiturany**

Ekstrakcja 1 ml próbki krwi i moczu eterem etylowym przy pH=2.

Analiza metodą HPLC-DAD w wersji faz odwróconych (RP) z użyciem kolumny jak do skryningu i warunków izokratycznego przepływu fazy (1cm<sup>3</sup>/min). Fazę ruchomą stanowiła mieszanina metanolu z 0,1M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (40;60) doprowadzona do pH=8,6 metanolemowym roztworem NaOH (5). Obliczeń dokonano przy długości fali 240 nm.

#### **Benzodiazepiny**

1 ml próbki krwi i moczu ekstrahowano mieszaniną etylu i chlorku butylu (1:4), przy pH=7,4 (0,07M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> i 0,07M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> zmieszane w stosunku 4:1), w obecności prazepamu jako standardu wewnętrznego, po uprzedniej enzymatycznej hydrolizie moczu (β-glukuronidazą i arylosulfatazą). Chromatograf cieczowy i kolumna były analogicznie jak w metodzie skryningowej. Jako fazę ruchomą użyto mieszaninę acetonitrylu (A) i wody z dodatkiem 85% kwasu ortofosforowego w ilości 100 μl/l wody (B). Przepływ fazy wynosił 1cm<sup>3</sup>/min w gradiencie zaprogramowanym w niżej podany sposób: start A-30%+B-70%, od 5 do 10 min: A-

55%+B45%, a po 15 min skład fazy wynosił: A–70%+B–30%). Obliczenia przeprowadzono przy długości fali 230 nm.

### **Morfina**

1 ml próbki krwi i moczu ekstrahowano mieszaniną chloroform+izopropanol (3:1) przy pH=9. Mocz poddawano uprzednio hydrolizie kwaśnej (stężonym HCl) i enzymatycznej wyżej podanym enzymem. Oznaczenie metodą HPLC–DAD–RP realizowano w systemie gradientu niskociśnieniowego przepływu fazy ( $1\text{ cm}^3/\text{min}$ ) stanowiącej mieszaninę acetonitrylu (A) i wody (B) zakwaszonej kwasem ortofosforowym jak przy benzodiazepinach. Program gradientu przedstawił się następująco: początek: A–15%+B85%, następnie liniowy wzrost składnika A (o 4,5 %/min) aby po 10 min skład fazy wynosił: A–60+B–40%. Obliczeń dokonano przy długości fali 212 nm.

Morfinę oznaczano również metodą GC/MS w postaci trimetylosililowej pochodnej. Do wstępnego przygotowania krwi zastosowano kolejno odbiałczanie kwasem trichlorooctowym (TCA), hydrolizę enzymatyczną i ekstrakcję na fazie stałej (kolumny Bond Elut Certify firmy Varian). Derywatyzację wyekstrahowanej z 2ml próbek krwi morfiny przeprowadzono bis(trimetylosililo)trifluoroacetamidem z dodatkiem 1% trimetylochlorosilanu (BSTFA+1%TMCS). Analizę prowadzono wobec trimetyloosililowej pochodnej morfiny D<sub>3</sub> jako standardu wewnętrznego. Do analizy ilościowej pobrano dwa jony trimetylosililowej pochodnej morfiny m/z 429 i m/z 414 oraz dwa jony (m/z 432 i m/z 417) takiej samej pochodnej morfiny–D<sub>3</sub>.

### **Efedryna**

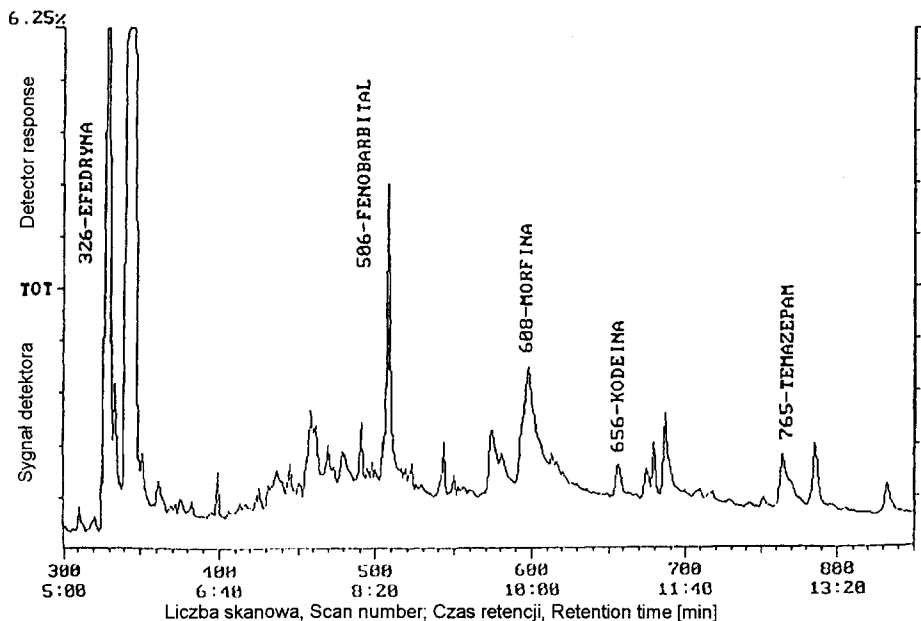
Efedrynę oznaczano według metody Bogusza (3), czyli po ekstrakcji eterem etylowym ze środowiska alkalicznego (pH=12) i derywatywacji fenyloizotiocyanianem. Pochodne analizowano metoda HPLC–RP z detekcją diodową. Rozdział tiomocznikowej pochodnej efedryny i metamfetaminy użytej jako standardu wewnętrznego prowadzono na kolumnie EcoCART 125x3 mm z wypełnieniem Superspher 60 RP–select B firmy Merck. Faza ruchoma składała się z acetonitrylu i 50 mM buforu mrówczanowoamonowego (pH=3), a jej przepływ wynosił 0,8  $\text{cm}^3/\text{min}$ . Obliczeń dokonano przy długości fali 250 nm.

## **WYNIKI**

W wyniku badania krwi i moczu metodą immunofluorescencji w świetle spolaryzowanym, z użyciem odpowiednich testów grupowego oznaczania, uzyskano wyniki dodatnie dla alkaloidów opium i często im towarzyszących pochodnych benzodiazepiny i kwasu barbiturowego. W przypadku zastosowania testu do wykrywania amfetaminy i metamfetaminy w moczu uzyskano wynik 0,33 mg/l, czyli powyżej granicy wykrywalności testu (0,09 mg/l), a poniżej wartości progowej (0,5 mg/l) przyjmowanej za wynik pozytywny przy grupowym wykrywaniu amfetamin w moczu immunotestami. W wyniku badań skryningowych moczu na leki kwaśne, obojętne i zasadowe przeprowadzonych metodą HPLC wykazano w odpowiednich ekstraktach z moczu fenobarbital, temazepam, morfina i efedrynę. Identyfikację analitów przeprowadzono na podstawie indeksów retencji względem mieszaniny wzorców o charakterze kwaśnym i mieszaniny wzorców o charakterze

zasadowym firmy Merck oraz przez porównanie przebiegu widm spektrofotometrycznych związków analizowanych z widmami wzorców z biblioteki.

Badając ekstrakt moczu ze środowiska alkalicznego metodą GC/MS potwierdzono w nim obecność efedryny, morfiny i temazepamu, a nawet fenobarbitalu, a także wykryto kodeinę (ryc. 1).



Ryc. 1. Chromatogram chloroformowego ekstraktu z moczu (pH=9) uzyskany z użyciem GC/MS firm Varian/Finnigan Mat w wersji Magnum wyposażonego w detektor w postaci pułapki jonowej (ITD), na kolumnie kapilarnej DB-5MS długości 30 m, średnicy 0,25 mm i grubości filmu 0,25  $\mu\text{m}$ , w programie temperaturowym 130°C–270°C z liniowym wzrostem o 20°C/min.

Fig. 1. GC/MS chromatogram of the chloroformic extract of urine (pH=9) obtained by using the Varian/Finnigan Mat Magnum with ITD, capillary DB-5MS column (30 m x 0,25 mm x 0,25  $\mu\text{m}$ ), temperature programming: 130°C–270°C at 20°C/min.

Analizę ilościową wykonano dobierając metody oznaczeń do odpowiedniego związku lub grupy związków. Podstawę do obliczeń stanowił stosunek pola powierzchni substancji badanej i standardu wewnętrznego w odniesieniu do odpowiedniej krzywej wzorcowej.

Oznaczone w badanych materiale stężenia ksenobiotyków przedstawiono w Tabeli I, przy czym porównano je ze znalezionymi w piśmiennictwie fachowym stężeniami pochodzącymi z przypadków śmiertelnych zatruć po przyjęciu pojedynczego związku.

Morfinę we krwi oznaczano dwoma metodami różniącymi się sposobem przygotowania próbki oraz techniką użytą do oznaczeń. Średnie stężenie morfiny wynosiło  $1,02 \pm 0,18$  mg/l. Do oznaczania morfiny w moczu użyto techniki HPLC, ale porównano dwie hydrolizy: kwaśną i enzymatyczną. Średnie stężenie morfiny wynosiło  $7,3 \pm 1,41$  mg/l.

Tabela I. Oznaczone stężenia [mg/l] ksenobiotyków we krwi i moczu.

Table I. The concentrations of xenobiotics [mg/l] in blood and urine.

| Metoda<br>Method                                | Materiał                   |         | Material             |           |
|---|----------------------------|---------|----------------------|-----------|
|   | Krew                       |         | Blood                |           |
| FPIA – Abbott                                   | 2,5 /Op                    | 7,9 /Ba | 1,44 /Bz             | 5,45 /Ep  |
| HPLC  | 1,15 /M                    | 8,9 /Ph | 1,15 /Te             |           |
| GC/MS   | 0,89 /M                    |         |                      |           |
| Stężenia śmiertelne (1)<br>Fatal concentrations | 0,2–2,3 /M                 | 64 /Ph  | 3,8–9,0 /Te          | 5,0 /Ep   |
|   | Mocz                       |         | Urine                |           |
| FPIA – Abbott                                   | 9,4 /Op                    | HI /Ba  | 42,6 /Bz             | 0,33 /A-M |
| HPLC  | 8,3 /M; h-k<br>6,3 /M; h-e |         | 71,5 /Te<br>11,7 /Ox | 68,1 /Ep  |
| GC/MS   | M + Co                     | Ph      | Te                   | Ep        |

A-M – Amfetamina-Metaamfetamina, Amphetamine-Metaamphetamine; Ba – Barbiturany, Barbiturates; Bz – Benzodiazepiny, Benzodiazepines; Co – Kodeina, Codeine; Ep – Efedryna, Ephedrine; h-e – hydroliza enzymatyczna, enzymatic hydrolysis; h-k – hydroliza kwaśna, acidic hydrolysis; HI – stężenie poza zakresem, high concentration; M – Morfina, Morphine; Op – Opiaty, Opiates; Ox – Oksazepam, Oxazepam; Ph – Fenobarbital, Phenobarbital; Te – Temazepam.

Stężenie fenobarbitalu we krwi mieściło się w zakresie stężeń terapeutycznych, temazepamu w zakresie stężeń toksycznych, a morfina i efedryna była obecna w tym materiale w stężeniach spotykanych w przypadkach śmiertelnych zatruc po przedawkowaniu każdej z nich oddzielnie.

Zarówno we krwi jak i w moczu nie stwierdzono obecności alkoholu.

## OMÓWIENIE

Na wysokie stężenie morfiny w moczu wskazywał wynik uzyskany metodą FPIA, wykrycie jej bez derywatywacji metodą GC/MS oraz stwierdzenie jej w ekstrakcie z moczu bez uprzedniej hydrolizy tego materiału.

W tym ekstrakcie z moczu – przygotowanym do skryningu – dwiema metodami chromatograficznymi GC/MS i HPLC wykazano tylko temazepam. Oznaczenie oksazepamu jako głównego metabolitu temazepamu było możliwe dopiero po hydrolizie enzymatycznej moczu. Staje się to zrozumiałe gdy weźmie się pod uwagę metabolizm i wydalanie temazepamu. Jest on wydalany z moczem głównie w postaci glukuronianu temazepamu i glukuronianu oksazepamu w ilości odpowiednio 75% i 5,8% przyjętej dawki. Postać wolna obu tych związków nie przekracza 1,5%. W tym samym ekstrakcie badanym metodą HPLC obecność kodeiny była bardzo podejrzana. Ze względu jednak na znaczną interferencję naturalnej matrycy biologicznej moczu użyto do wykrycia kodeiny technikę GC/MS.

Stosowanie technik immunoenzymatycznych do wstępnej analizy jest bardzo celowe w przypadkach istnienia jakichkolwiek przesłanek o przyjmowaniu środków uzależniających, a w innych przypadkach znacznie ułatwia przebieg dalszych badań, zwłaszcza gdy mamy do czynienia z niewielką ilością materiału nadestającego do badań (4). Jest ogólnie znane, że testy TDx przeznaczone do wykrywania opiatów prawie nie dają błędnych ujemnych wyników, a błędnych dodatnich spotyka się bardzo mało. Trochę inaczej jest z testami do wykrywania barbituranów. Obserwuje się bowiem bardzo zróżnicowaną reaktywność poszczególnych barbituranów z testami ich grupowego wykrywania w moczu. Barbitał w ogóle nie daje reakcji krzyżowej z testami TDx. Testy do wykrywania benzodiazepin w surowicy są słabo reaktywne z triazolobenzodiazepinami, a ich wysoka czułość (12 ng/ml) zmusza do zainteresowania się niskimi wynikami, które są bardzo istotne w przypadku flunitrazepamu. Najbardziej dyskusyjne wydaje się stosowanie testów TDx na amfetaminę i metamfetaminę do sekcyjnego moczu. Przy takiej analizie należy pamiętać, o niskiej reaktywności tych testów z metylenodioksy- analogami amfetaminy i wysokiej reaktywności z 2-fenyletyloaminą, która jako produkt rozkładu aminokwasu feniloalaniny powstaje w moczu podczas przechowywania, a także może występować jako naturalny składnik świeżego moczu (7). W niniejszym przypadku wynik badania moczu testami TDx na amfetaminę i metamfetaminę był prawidłowy mimo wysokiego stężenia efedryny w moczu. Efedryna w stężeniu 1 mg/l daje odczyt dla zastosowanego testu poniżej jego granicy wykrywalności.

Skojarzone działanie oznaczonych ksenobiotyków na organizm ludzki nie wymaga omówienia. Efedryna przy przedawkowaniu wykazuje podobne działanie do amfetaminy, a jest łatwiej dostępna i nie znajduje się pod kontrolą prawną. Zainteresowanie tym związkiem przez osoby przyjmujące środki uzależniające jest duże i doprowadziło do spopularyzowania wyprodukowanego z efedryny silnie działającego środka jakim jest efedron (2).

## WNIOSKI

Obecność wykrytych ksenobiotyków we krwi i w moczu jest typowa dla polskiego narkomana. Wyniki pełnej analizy toksykologicznej płynów ustrojowych pobranych w czasie sekcji zwłok długoletniego narkomana, przeprowadzonej wiarygodnymi metodami analitycznymi są jednym z podstawowych elementów oceny ciężkości zatrucia i stanowią dobrą podstawę do wyciągnięcia wniosków. Wykryte związki w oznaczonych stężeniach mogły, zdaniem analityka, stanowić zagrożenie życia.

## PIŚMIENNICTWO

1. Baselt R.C., Cravey R.H.: *Disposition of Toxic Drougs and Chemicals in Man*. Year Book Medical Publishers, Inc., Chicago, 1990. – 2. Błaszczuk J., Krawczyk W., Piotrowski G., Wejman D.: *Efedron. Nielegalna produkcja z proasthminu*. Problemy Kryminalistyki, 1996, 211, 7–14. – 3. Bogusz M.J., Kała M., Maier

R.D.: *Determination of phenylisothiocyanate derivatives of amphetamine and its analogues in biological fluids by HPLC-APCI-MS or DAD*. J.Anal. Toxicol., 1997, 21, 59-69. – 4. Chacia T., Kała M.: *Analiza próby krwi w toksykologii sądowej*. Zeszyty naukowe KiZMS SAM, 1995, 4, 201-208. – 5. *Clarke's Isolation and Identification of Drugs*. 2nd ed. The Pharmaceutical Press, London, 1986. – 6. Kała M., Gubała W.: *The application of Abbott TDx opiates, benzodiazepines and REA ethanol assays in forensic toxicology*. TIAFT Proceedings of the 25th International Meeting. Ed. by Uges D.R.A. and de Zeeuw R.A., Groningen, 1988, 180-194. – 7. King L.A.: *Poortman-van der Meer A.J., H.Huizer: 1-Phenylethylamines: a new series of illicit drugs?* For. Sci. Int., 1996, 77, 141-149. – 8. Merck Tox Screening System (MTSS). Instruction Manual for Program version 3.1, 21. – 9. Raszeja S.: *Publikować kazuistykę? Tak, ale... (referat dyskusyjny)*. Arch. Med. Sąd. Krym., 1996, 46, 71-72.

Adres autorów:

Instytut Ekspertyz Sądowych

ul. Westerplatte 9

31-033 Kraków

Nadesłano do Redakcji: 31.01.1997

Zakwalifikowano do druku: 1.031997